
(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 000047065 A
(43)Date of publication of application: 25.07.2000

(21)Application number: 980063818
(22)Date of filing: 31.12.1998

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
(72)Inventor: KIM, SEUNG HO
MIN, TAE IK
PARK, CHAN SEON
AHN, JONG SEOK
LEE, HEON JU
LEE, HYEON SEON
JU, YUN JEONG

(51)Int. Cl. C12N 1/20
C12N 15/31

(54) NOVEL LACTOBACILLUS SP. MT-1077 (KCTC 8903P) AND NOVEL BACTERIOCIN PRODUCED THEREFROM

(57) Abstract:

PURPOSE: A novel lactobacillus sp. MT-1077 (KCTC 8903P) and a novel bacteriocin produced therefrom are provided. The bacteriocin has stability against broad range of pH, heat stability and antifungal activity and used as food preservation agent, biological fermentation regulator, and antifungal agent.

CONSTITUTION: A lactobacillus MT-1077 is isolated from Kimchi. The method for purifying bacteriocin from lactobacillus MT-1077 comprises the steps of: incubating lactobacillus MT-1077 in MRS broth; precipitating the lactobacillus MT-1077 fermented culture broth by addition of ammonium hydrogen sulfate; passing the protein precipitates through the column packed with carboxymethyl sepharose CL-6B and eluting the adsorbed protein with 0.1M sodium chloride; passing the elutes through the column packed with phenyl sepharose CL-4B and eluting the adsorbed protein with 10% ammonium hydrogen sulfate solution; and purifying the elutes by HPLC

COPYRIGHT 2000 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19981231)
Notification date of refusal decision (20010620)
Final disposal of an application (rejection)
Date of final disposal of an application (20010620)
Patent registration number (1003516220000)

Date of registration (20020823)

Number of trial against decision to refuse (2001101002113)

Date of requesting trial against decision to refuse (20010703)

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 6
C12N 1/20
C12N 15/31

(11) 공개번호 특2000-0047065
(43) 공개일자 2000년07월25일

(21) 출원번호 10-1998-0063818
(22) 출원일자 1998년12월31일

(71) 출원인 한국과학기술연구원 박호균
서울특별시 성북구 하월곡동 39-1

(72) 발명자 민태익
서울특별시 성동구 응봉동 대림아파트 2동 102호
안중석
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 110동1204호
이현주
대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 101동 1302호
박찬선
대전광역시 대덕구 법동 삼호아파트 4동 301호
김승호
대전광역시 유성구 가정동 236 KIT교수아파트 12동 204호
이현선
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 119동703호
주윤정
대전광역시 중구 석교동 7-12

(74) 대리인 백남훈
허상훈

심사청구 : 있음

(54) 신규 락토바실러스 속 (LACTOBACILLUS SP.)MT-1077 및 그로부터 생산되는 신규 박테리오신

요약

본 발명은 신규 락토바실러스 속 (Lactobacillus sp.) MT-1077 (KCTC 8903P) 및 그로부터 생산되는 신규 박테리오신에 한 것으로서, 더욱 상세하게는 항균성 펩티드인 박테리오신을 생산하는 김치에서 분리한 젖산균, 락토바실러스 속 MT-1077 균주, 상기 균주에 의해 생산되는 신규 박테리오신, 락토바실러스 속 MT-1077로부터 박테리오신의 정제방법, 및 락토바실러스 속 MT-1077 또는 상기 박테리오신을 포함하는 식품보존제, 발효조절제 또는 항균제에 관한 것으로서, 본 발명의 신규 박테리오신은 넓은 범위의 pH 안정성 및 열 안정성을 나타내며 여러 미생물에 대해 항균 특성을 가지므로 식품보존제, 생물적 발효조절제 또는 항균제로서 이용될 수 있는 효과가 있다.

대표도

도1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 김치 발효 중 pH 변화를 나타낸 그래프,
도 2는 김치 발효 중 총 균수의 변화를 나타낸 그래프,
도 3은 김치 발효 중 총 루코노스톡 속 균수의 변화를 나타낸 그래프.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 신규 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.) MT-1077 및 그로부터 생산되는 신규 박테리오신에 관한 것으로서, 육 상세하게는 항균성 펩티드인 박테리오신을 생산하는 김치에서 분리한 젖산균, 락토바실러스 속 MT-1077 균주 및 상주에 의해 생산되는 신규 박테리오신에 관한 것이다.

젖산균은 다양한 식품의 발효에 관여하여 독특한 풍미를 부여할 뿐만 아니라, 항균성 물질을 생산하여 식품의 저장성 및 성을 증대시키는 효과가 있다. 이러한 젖산균이 생산하는 항균성 물질로는 젖산 등의 유기산 이외에 과산화수소, 디아세틸, 박테리오신 등이 널리 알려져 있다.

한편, 박테리오신은 항균성 펩티드 또는 단백질로서 소화계의 여러 단백질 분해효소에 의해 분해되므로 인체에 무해하고 류성이 없으며, 직접적인 유전자 조작 등에 의한 생물학적 응용이 용이하다는 측면에서 기존의 화학적 식품보존제를 대체 수 있는 새로운 생물학적 보존제로서 최근 크게 주목받고 있다.

따라서, 인류가 오랫동안 섭취해 왔고 미국 식품 의약품 안전국 (FDA)에 의해 안전하다고 인정된 젖산균과 젖산균이 생산하는 박테리오신은 소비자들의 화학 첨가제 사용에 대한 거부감을 유발하지 않으면서 열처리가 최소화된 식품의 안정성을 하기 위한 방안으로 매우 유용하다.

락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)가 생산하는 박테리오신인 니신 (nisin)은 1947년 발견된 이래 많은 연구가 이루어졌고, 광범위한 항균 범위 때문에 세계 각국에서 이미 오래 전부터 사용이 허용되어 있으며, 미국에서도 1988년부터 FD/GRAS (generally recognized as safe) 식품 첨가물로 인정하게 되었다.

따라서, 이러한 특성을 가진 박테리오신을 이용하여 다양한 미생물이 관여하는 발효 식품에서 유용한 미생물에는 영향을 지 않고 바람직하지 않은 미생물의 번식을 제어할 수 있다면 발효 식품산업에서 생물학적 조절 및 산업적 안정성 증대에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명자들은 상술한 바와 같은 발효식품에서 유용성을 갖는 젖산균 및 박테리오신을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과 소류 발효식품으로서 그 종류가 다양하며 채소류 기원 젖산균의 보고인 김치의 발효에 관여하는 젖산균을 대상으로 박테 신 생산 균주를 탐색한 결과, 박테리오신을 생산하는 신규 젖산균을 분리, 동정하고 그로부터 생산되는 신규 박테리오신을 제함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 박테리오신을 생산하는 신규 락토바실러스 속 균주를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 신규 락토바실러스 속 균주로부터 생산되는 신규 박테리오신을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 신규 락토바실러스 속 균주로부터 신규 박테리오신의 정제방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 신규 락토바실러스 속 균주 또는 신규 박테리오신을 포함하는 식품보존제, 발효조절제 또는 항균제 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 박테리오신을 생산하는 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.) MT-1077을 그 특징으로 한다.

본 발명은 서열 1에 기재된 아미노산 서열을 갖으며, 분자량이 5140.6 Da이고, 상기 락토바실러스 속 MT-1077로부터 얻어지는 신규 박테리오신을 다른 특징으로 한다.

본 발명은 서열 1에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 또 다른 특징으로 한다.

본 발명은 상기 락토바실러스 MT-1077 균주의 배양액에 황산암모늄을 첨가하는 황산암모늄 침전단계; 상기단계에서 수득한 침전물의 양이온교환 크로마토그래피 단계; 상기 단계에서 수득한 용출액의 소수성 흡착 크로마토그래피 단계; 그리고, 상기 단계에서 수득한 용출액의 고속 액체크로마토그래피 단계를 포함하는 락토바실러스 속 MT-1077로부터 박테리오신의 정제방법을 그 특징으로 한다.

본 발명은 상기 락토바실러스 속 MT-1077 또는 상기 신규 박테리오신을 포함하는 식품보존제, 발효조절제 또는 항균제인 것을 특징으로 한다.

이와 같은 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다: 본 발명의 박테리오신을 생산하는 락토바실러스 속 MT-1077는 김치로부터 다음과 같이 분리한다.

우선, 종류에 제한없이 수집한 김치로부터 집락 형태가 서로 다른 젖산균들을 순수 분리하여 젖산균용 액체 배지에 배양하여 지시균이 포함된 배지를 첨가한 다음 집락 주위에 억제환이 생성된 균주중 단백질 분해효소 처리에 의해 억제환이 상실된 배양 상층액에 박테리오신 활성이 있는 균주를 선발한다.

본 발명에 있어서, 박테리오신 활성은 본 발명이 속하는 기술분야에서 상용화된 활성측정법 (the well-diffusion assay; Ly W. J. and Glatz, B. A., Appl. Environ. Microbiol., 59, 83~88(1993))에 따라 실시한다.

상기와 같이 선별 분리된 본 발명의 신규 젖산균은 그의 형태적, 배양적 및 생리학적 특성을 조사한 결과, $0.6 \sim 0.7 \times 1.1 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 간균으로서, 포자를 형성하지 않고 운동성이 없는 것으로 나타났다. 또한 혐기적 및 기적 조건에서 모두 잘 생장하였고 10°C 로부터 42°C 까지의 넓은 온도 범위에서 생육 가능하였으며, 그람 양성균으로 확인되었다.

상기의 분류학적 특성을 분석한 본 발명에서 분리된 균주는 락토바실러스 속 세균으로 동정하였으며, 이 균주를 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.) MT-1077로 명명하고, 대한민국 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 1998년 8월 20일자로 기탁하였으며, 기탁번호 KCTC 8903P를 부여받았다.

본 발명의 락토바실러스 속 MT-1077로부터 박테리오신을 정제하는 방법은 락토바실러스 MT-1077 균주의 배양액에 황산암모늄을 첨가하는 황산암모늄 침전단계; 상기단계에서 수득한 단백질 침전물의 양이온교환 크로마토그래피 단계; 상기 단계에서 수득한 용출액의 소수성 흡착 크로마토그래피 단계; 그리고, 상기 단계에서 수득한 용출액의 고속 액체크로마토그래피 단계를 포함한다.

상기 정제방법에 있어서, 락토바실러스 속 MT-1077의 배양액은 MRS (De Man, J. C. et al., J. Appl. Bacteriol., 23, 130~135(1960)) 액체배지가 바람직한 바, 그 이유는 상기 배양액이 젖산균 배양용 배지이며 액체배지이어야 상용화된 박테리오신 분리가 가능하기 때문이다.

한편, 황산암모늄 침전단계에서는 75%까지 황산암모늄으로 포화시켜 침전시키는 것이 바람직하고, 75% 미만인 경우 배양액 중에 존재하는 본 발명의 박테리오신이 전량 침전하지 않고, 75%를 초과하는 경우에는 박테리오신 이외의 다른 물질 화합물이 과다하게 침전되기 때문이다.

이어, 양이온교환 크로마토그래피를 실시하는 바, 이때 이용되는 양이온교환 수지는 아가로스 수지가 바람직하고, 이중에 카복시메틸기를 갖는 교환수지가 가장 바람직하다.

그런 다음, 소수성 흡착 크로마토그래피를 실시하는 바, 이때 이용되는 소수성 흡착 수지는 아가로스 수지가 바람직하고,

중에서 페닐기를 갖는 교환수지가 가장 바람직하다.

그리고 나서, 고속 액체크로마토그래피를 실시하는 바, 이때 이용되는 수지는 역상 실리카가 바람직하고, 이 중에서 C_{18} 알킬기 (alkyl chain)를 갖는 실리카 수지가 가장 바람직하다.

이렇게 하여 정제된 박테리오신은 분자량 5140.6 Da의 순수한 화합물로 밝혀졌으며, 여러 미생물에 대해 항균 특성을 나타냈고, 넓은 pH 안정성과 열 안정성을 갖는 것으로 나타나 식품보존제, 발효조절제 또는 항균제로서의 이용 가능성을 보였

또한, 상기 박테리오신의 아미노산 서열을 분석한 결과, 종래에 공지된 박테리오신 서열과는 상이함을 알 수 있었으며, 0 본 발명 박테리오신은 신규한 것임을 확인하였고, 이를 AP1077이라 명명하였다.

본 발명의 신규 박테리오신은 상술한 특성에 기초하여 식품보존제 또는 항균제로서의 용도를 갖으며, 발효식품에 첨가하 경우에는 발효조절제로서의 용도를 갖는다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1 : 김치로부터 박테리오신 생산 젖산균의 분리단계 1: 젖산균의 분리 및 보존젖산균 분리원 김치는 김치 종류에 관계없이 수집하여 냉장 보관하면서 24시간 이내에 0.85% 멸균 생리식염수에 10배수로 단계 희석한 후 0.1ml씩 MRS, m-LE (Miyao, S. and Ogawa, T., Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 35, 610~617(1988)), PES (Miyao, S. and Ogawa, T. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 35, 610~617(1988)) 및 M-엔테로코쿠스 (M-Enterococcus) 고체배지 (Miyao, S. and Ogawa, T., Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 35, 610~617(1988))에 각각 도말하여 30℃에서 배양한 다음, 집 형태가 서로 다른 균주들을 선택하여 순수 분리하였다.

이어, 상기 김치로부터 분리한 젖산균을 MRS 고체배지에서 30℃로 배양하고, 이때 형성된 집락을 20% 글리세롤 용액에 탁시킨 후 -70℃ 냉동고에 보관하면서 하기 박테리오신 생산 젖산균의 탐색에 사용하였다.

단계 2: 박테리오신 생산 젖산균의 탐색 및 선발상기 냉동 보관된 젖산균 균주를 MRS 액체배지에서 30℃로 18시간동안 배양한 후, 배양액을 MRS-0.2 (글루코스 0.2%) 고체배지에 3 μ l 점적하였다. 이어, 30℃에서 18시간 배양하여 집락이 형성된 MRS 액체배지에서 배양한 지시균 4종 (락토바실러스 델브레키-락티스, ACTC 4799; 락토바실러스 비리덴센스, KCTC 3504; 페디오코커스 애씨디락티시, KCTC 3507)을 5 \times 10

$6 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml로 접종한 MRS 반고체배지 (MRS 및 한천 0.7%) 5ml 각각을 상기 고체배지에 부어 굳혔다. 그런 다음, 시균에 따른 적정 배양온도에서 배양한 후 집락 주위의 억제환 생성 여부를 관찰함으로써 박테리오신 생산 젖산균을 선별하였다.

한편, 상기 억제환이 항균성 단백질 혹은 펩타이드인 박테리오신에 의한 것임을 확인하기 위하여 단백질분해효소인 알파 모트립신, 트립신 그리고 프로테아제 IX 및 XIV 용액을 억제환 주위에 점적 처리한 후 억제환 상실을 조사하였다.

또한, 박테리오신을 형성하는 젖산균으로 추정되는 집락을 최종적으로 검증하기 위하여 박테리오신의 활성을 측정하였는 상기 억제환을 형성한 집락을 MRS 액체배지에서 30℃로 18시간동안 배양한 후, 상기 배양액 200 μ l를 원심분리하고 이 때 성된 배양액을 가지고 상기한 웰-확산 분석법으로 박테리오신의 활성을 측정하여 세포밖으로 항균성 물질을 분비하는 균를 최종적으로 선발하였다.

실시예 2 : 김치로부터 분리한 박테리오신 생산 젖산균의 분류학적 성질 및 동정본 발명에 따라 분리된 신규 젖산균의 미생학적 특징은 다음과 같다:(1) 형태적 특성상기 실시예 1에서 분리, 선발된 균주를 MRS 고체배지에서 30℃로 18시간동안 배양한 후 조사한 형태적 특성을 조사하였으며, 그 결과는 다음 표 1에 나타내었다:

[표1]

형 태	간 형
크 기 (μ m)	0.6~0.7 \times 1.1~3.5

포 자	형성 없음
운동성	없음

상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 의해 분리된 신균주는 간균으로서 그 크기는 $0.6 \sim 0.7 \times 1.1 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 였고, 포자 형성하지 않으며 운동성이 없었다.

(2) 배양적 특성상기 실시예 1에서 분리된 신균주를 MRS 고체배지에서 배양하면서 배양적 특성을 조사하였으며, 그 결과 다음 표 2에 나타내었다. 한편, 배양시 혐기적 조건은 Cowan과 Steel의 방법(Cowan, N. R. and Steel, K. J., Manual of identification of medical bacteria, Williams & Wilkins, 2nd eds.(1984))에 의해 이루어진 것이다.

[표2]

배양조건	호기	생 장
	혐기	생 장
배양온도 (°C)	15	생 장
	30	생 장
	37	생 장
	40	생 장
	42	생 장
	45	생장안함

상기 표 2에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 의해 분리된 신균주는 호기 및 혐기의 배양조건에서 모두 잘 생장을 하였으며 15~42°C까지 넓은 온도범위에 걸쳐 생장이 가능하였다.

한편, 본 발명 신균주는 MRS 고체배지에서 최대지름 1mm 이내의 크기가 작은 유백색의 원형 집락을 형성하였다.

(3) 생리학적 특성상기 실시예 1에서 분리된 신균주의 생리학적 특성을 조사한 결과 다음 표 3과 같았다:

[표3]

그람염색		양 성
카탈라제 생산		생산 안함
옥시다제 생산		생산 안함
산화/발효		발 효
포도당으로부터의 가스 생성		생성 안함
당 이용성	포도당	이 용
	아라비노스	이 용
	갈락토스	이용하지 않음
	맥아당	이 용
	만니톨	이용하지 않음
	멜리비오스	이용하지 않음
	라피노스	이용하지 않음
	살리신	이 용
에스쿨린 가수분해		가수분해
술비톨		이용하지 않음

상기 표 3에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 의해 분리된 신균주는 그람 양성균으로서 카탈라제 및 옥시다제를 생산하지 다.

(4) 동정상술한 형태적, 배양적 및 생리학적 특성을 분석한 결과 본 발명 박테리옌 생산 젖산균은 락토바실러스 속 세균

로 동정되었으며, 이 균주를 락토바실러스 속 MT-1077 (*Lactobacillus* sp. MT-1077)로 명명하고, 대한민국 한국과학기술원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 1998년 8월 20일자로 기탁하고, 기탁번호 KCTC 8903P를 부여받았다.

실시에 3: 락토바실러스 속 MT-1077로부터 박테리오신의 정제본 발명 정제방법에 있어서, 박테리오신 활성의 확인은 상한 웰-확산 분석법에 따라 수행하였다.

단계 1: 황산암모늄 침전우선, 멸균한 MRS 액체배지 1ℓ에 액체 배양한 락토바실러스 MT-1077 균주 10ml를 접종하고 3ℓ에서 20시간 동안 배양하고, 배양액을 원심분리 (8,500×g, 20분, 4℃)하여 상등액을 얻었다. 한편, 락토바실러스 속 MT-1077이 생산하는 박테리오신은 균주의 대수증식기에서 생산되고 정지기 이후에는 생산이 중단되어 정지기 초에 가장 높

박테리오신 활성도를 나타내었다.

이어, 상기 상등액을 매우 천천히 교반하면서 황산암모늄 516g을 천천히 가하여 75%까지 포화시킨 후 하룻밤 동안 4℃ 계속하여 교반하였다.

그런 다음, 상기 용액을 원심분리 (10,000×g, 20분, 4℃)하여 단백질을 회수하고, 10mM 인산나트륨 완충용액 (pH 5.0) 100ml에 용해한 후 분자량 2,500이상을 거르는 투석 튜브 (Spectra-Por사)에 넣어 4℃의 동일한 완충용액 2ℓ에서 하룻밤

석시켰다.

그리고 나서, 투석한 황산암모늄 침전 분획을 100℃에서 5분간 가열한 후 원심분리 (10,000×g, 20분, 4℃)하여 효소를 한 열에 불안정한 단백질을 제거하였다.

단계 2: 양이온교환 크로마토그래피 10mM 인산나트륨 완충용액 (pH 5.0)으로 평형상태를 이룬 카복시메틸 세파로스 CL (CM-Sepharose CL-6B, Pharmacia Biotech사)를 채운 1.6×13cm 칼럼에 상기 투석이 종료된 시료를 로딩하였다. 이 0.1M 염화나트륨 용액의 선형 농도구배를 이용하여 양이온 교환수지에 결합된 단백질을 용출하였으며, 용출액중 박테리오신 활성이 있는 분획을 수집하여 동결건조시켰다. 그런 다음, 동결건조된 박테리오신 시료를, 황산암모늄 10% 첨가된 10ml 인산나트륨 완충용액 (pH 5.0)에 용해시켰다.

단계 3: 소수성 흡착 크로마토그래피상기 황산암모늄 10% 첨가된 10mM 인산나트륨 완충용액 (pH 5.0)과 동일한 용액으로 평형상태를 이룬 페닐 세파로스 CL-4B (Phenyl Sepharose CL-4B, Pharmacia Biotech사)를 채운 1.6×6cm 칼럼에 상 단계 2를 거친 시료를 로딩하였다. 이어, 10% 황산암모늄 용액의 선형 역농도구배를 이용하여 흡착된 단백질을 용출하였으며, 용출액중 박테리오신 활성이 있는 분획을 수집하여 동결 건조시켰다. 그런 다음, 동결건조된 박테리오신 시료를 0.1% 리플루오로아세트산 용액에 용해시켰다.

단계 4: 고속 액체크로마토그래피상기 0.1% 트리플루오로아세트산 용액으로 평형시킨 C

18 컬럼 (10×250mm, Waters사)에 상기 단계 4를 거친 시료를 주입하였다. 이어, 고속 액체크로마토그래피 (Shimadzu)를 이용하여 80% 아세토니트릴까지의 선형 농도구배로 용출하였으며, 박테리오신 활성을 나타내는 분획을 모아서 동결시켰다. 그런 다음, 동결건조된 박테리오신 시료를 0.1% 트리플루오로아세트산 용액에 용해시켜 다시 위의 방법대로 역 고속 액체크로마토그래피 (reverse HPLC; Shimadzu Co., Japan)로 재분석하였다.

역상 고속 액체크로마토그래피로 분리한 박테리오신을 MALDI-질량분석기 (Ompact Maldi II, Kratos analytical, Englar)로 분석한 결과, 분자량 5140.6Da의 순수한 화합물로 나타났다.

실시에 4: 락토바실러스 속 MT-1077로부터 정제된 박테리오신의 특성상기 실시에 3에서 단계 1 황산암모늄 침전 단계를 거친 시료를 10mM 인산나트륨 완충용액 (pH 6.0)에 하룻밤 동안 완충 용액을 3회 이상 교환하면서 투석시킨 다음, 동결건조시켜 부분 정제된 박테리오신 시료를 수득하였다. 이어, 활성도가 배양 상등액의 10배가 되도록 10mM 인산나트륨 완충 (pH 6.0)에 용해하여 본 발명 박테리오신의 pH 안정성, 열 안정성, 효소처리에 따른 활성 변화 및 항균 범위를 조사하였 그 결과는 표 4~7에 각각 나타내었다. 한편, 박테리오신의 활성은 상기한 웰-확산 분석법에 따라 측정하였다.

[표4]

pH	상대활성도 (%)
2.0	100

3.0	100
4.0	100
5.0	100
6.0	100
7.0	100
8.0	100
9.0	100
10.0	100
11.0	100

상기 표 4에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 박테리오신은 넓은 범위의 pH에 걸쳐 높은 안정성을 나타내었다.

[표5]

열 처리 조건		상대활성도 (%)
온 도 (℃)	시 간 (분)	
100	10	100
	20	100
	30	75
121	10	37.5
	20	12.5
대조군		100

상기 표 5에서 확인할 수 있듯이, 본 발명 박테리오신은 100℃에서 활성도가 높게 나타나는 바, 열안정성이 높다는 것을 수 있었다.

[표6]

처리 효소	상대 활성도 (%)
카탈라제	100
리파제	100
펩신	0.4
트립신	0
프로테아제 III	0
프로테아제 IX	0
프로테아제 XIV	0
알파키토트립신	0
대조군	100

상기 표 6에서 알 수 있듯이, 본 발명 박테리오신은 카탈라제 및 리파제 처리에 영향을 받지 아니하였고, 단백질 분해 효소 펩신, 트립신, 알파키토트립신, 프로테아제 III, IX 및 XIV에 의해 항균활성이 완전히 소실되었는 바, 이에 본 발명 항균 효 물질은 단백질성 물질인 박테리오신임을 확인할 수 있었다.

[표7]

--	--

시 험 균	항균활성
락토바실러스 브레비스 아종 브레비스 (KCTC 3489)	없음
락토바실러스 플란타룸 (KCTC 3099)	강함
락토바실러스 델브레키-락티스 (ATCC 4797)	없음
락토바실러스 비리데센스 (KCTC 3504)	없음
락토바실러스 힐가리디 (KCTC 3500)	없음
락토바실러스 파라부크네리 (KCTC 3503)	없음
락토바실러스 애니말리스 (KCTC 3501)	없음
락토바실러스 바지날리스 (KCTC 3515)	없음
락토바실러스 델브레키-락티스 (KCTC 1058)	없음
락토바실러스 콘퍼수스 (KCTC 3499)	없음
락토바실러스 파라카제이 아종 파라카제이(KCTC 3510)	보통
루코노스톡 카노숨 (KCTC 3525)	없음
루코노스톡 락티스 (KCTC 3528)	없음
루코노스톡 메센테로이드스 아종 메센테로이드스 (KCTC 3505)	없음
루코노스톡 메센테로이드스 아종 크레모리스 (KCTC 3529)	없음
루코노스톡 메센테로이드스 아종 텍스트라니쿰 (KCTC 3530)	없음
루코노스톡 파라메센테로이드스 (KCTC 3531)	없음
루코노스톡 아벨리비오숨 (KCTC 3524)	없음
루코노스톡 씨트레움 (KCTC 3526)	없음
루코노스톡 슈도메센테로이드스 (KCTC 3532)	없음
페디오코커스 애씨디락티스 (KCTC 3101)	보통
페디오코커스 펜토싸세우스 (KCTC 3507)	보통
엔테로코커스 페씨움 (KCTC 3095)	보통
리스테리아 모노사이토제네스 (KCTC 3444)	없음
스타필로코커스 아우레우스 209 (KCTC 1916)	약함
스타필로코커스 아우레우스 R-209 (KCTC 1928)	없음
칸디다 알비칸스 IFO 1594 (KCTC 1940)	없음
에셀리시아 콜라이 BE 1186 (KCTC 1924)	없음
살모넬라 티피모리움 SL 1102 (KCTC 1926)	없음
바실러스 서브틸리스 (KCTC 1023)	없음
바실러스 쉐레우스 (KCTC 1013)	없음

상기 표 7에서 확인할 수 있듯이, 본 발명 박테리오신은 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 파라카제이 아종 파라카제 페디오코커스 애씨디락티스, 페디오코커스 펜토싸세우스, 엔테로코커스 페씨움 뿐만 아니라 병원성 세균인 스타필로코커스 아우레우스에도 항균 활성을 보였으며, 이에 식품보존제, 발효조절제 또는 항균제로서의 적용가능성을 알 수 있었다.

실시에 5: 본 발명 박테리오신의 아미노산 서열 분석상기 실시예 3에서 정제된 박테리오신의 아미노산 서열은 자동화된 (만 방법 (Edman degradation method; Edman, P. and Henschen, A., In Protein Sequence Determination, ed. Needleman, S. B., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y. 232~279(1975))에 따라 기체상 아미노산 서열 분석기 (Applied Biosystem Inc., Foster, USA)로 그 아미노-말단으로부터 그 서열을 분석하였으며, 그 결과는 서열 1과 같다.

한편, 서열 1과 같은 아미노산 서열은 현재까지 보고된 박테리오신의 아미노산 서열과 일치되지 않음을 확인함으로써 본 발명 박테리오신이 신규한 것임을 알 수 있었다.

이에, 본 발명자들은 상기 신규 박테리오신을 AP1077이라 명명하였다.

실시에 6: 본 발명 박테리오신이 배추김치 발효에 미치는 영향멸균한 MRS 액체배지 1ℓ에 액체 배양한 락토바실러스 MT-1077 균주 10mℓ를 접종한 후, 30℃에서 20시간 동안 배양하여 박테리오신이 생산되게 하고, 배양액을 원심분리 (8,500×20분, 4℃)하여 박테리오신이 포함된 상등액을 얻었다. 한편, 배추김치 (배추 100%, 파 4%, 설탕 1%, 마늘 2%, 생강 1, 고춧가루 2%, 멸치액젓 1.4%)를 담아 배추김치 200g에 대해 상기 상등액 100g을 첨가하였다.

대조구로는, 젖산과 초산을 2:1의 비율로 섞은 용액으로 배양 상등액을 첨가한 김치의 pH와 같게 조정된 배추김치를 사용하였다.

상기한 김치를 20℃ 항온기에서 발효시키면서 김치액의 pH, 총균수 및 루코노스톡 속 균수를 조사하였다. 첨부 도 1에서 인할 수 있듯이, 락토바실러스 MT-1077의 배양 상등액을 첨가한 배추김치의 pH가 발효 10일째까지 대조구보다 높게 유지되어 김치의 숙성과 산패를 지연시키는 것으로 나타났다.

또한 도 2 및 도 3에서 보듯이 총균수와 루코노스톡 속 균수도 발효 기간 대부분에서 락토바실러스 MT-1077의 배양 상등액을 첨가한 배추김치가 대조구보다 낮아 배추김치의 발효가 느리게 진행되는 것으로 나타났다.

따라서 본 발명 박테리오신이 발효 조절제 또는 식품보존제로서의 우수한 효과를 확인할 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하였듯이, 본 발명은 박테리오신을 생산하는 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.) MT-1077 (KCTC 8903P)을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 속 MT-1077로부터 생산되는 신규 박테리오신 및 이의 정제방법을 제공한다. 한편, 본 발명은 락토바실러스 속 MT-1077 또는 상기 박테리오신을 포함하는 식품보존제, 발효조절제 또는 향균제를 제공한다. 본 발명의 신규 박테리오신은 넓은 범위의 pH 안정성 및 열 안정성을 나타내며 여러 미생물에 대해 항균을 갖는 바, 식품보존제, 생물학적 발효조절제 또는 향균제로서 이용될 수 있는 효과가 있다.

서열번호: 1

서열의 길이: 33

서열의 타입: 아미노산

토폴로지: 선형

분자의 타입: 폴리펩티드

기원

생물명: 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.)

주명: MT-1077

(57)청구의 범위

청구항1

박테리오신을 생산하는 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.) MT-1077 (KCTC 8903P).

청구항2

서열 1에 기재된 아미노산 서열을 갖으며, 분자량이 5140.6 Da이고, 상기 청구항 1의 락토바실러스 속 MT-1077로부터 산되는 신규 박테리오신.

청구항3

서열 1에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA.

청구항4

다음과 같은 단계를 포함하는 락토바실러스 속 MT-1077로부터 박테리오신의 정제방법:

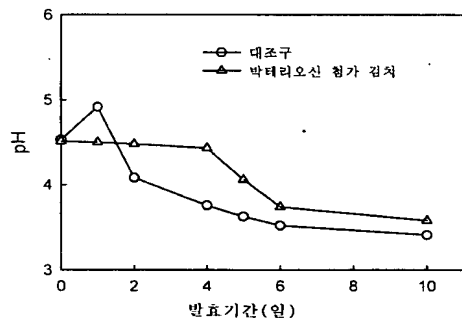
- (i) 상기 락토바실러스 MT-1077 균주의 배양액에 황산암모늄을 첨가하는 황산암모늄 침전단계;
- (ii) 상기단계에서 수득한 단백질 침전물의 양이온교환 크로마토그래피 단계;
- (iii) 상기 단계에서 수득한 용출액의 소수성 흡착 크로마토그래피 단계; 그리고
- (iv) 상기 단계에서 수득한 용출액의 고속 액체크로마토그래피 단계.

청구항5

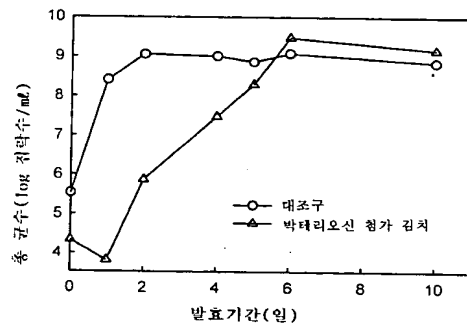
상기 청구항 1의 락토바실러스 속 (Lactobacillus sp.) MT-1077 또는 청구항 2의 박테리오신을 포함하는 식품보존제, 발조절제 또는 항균제.

도면

도면1



도면2



도면3

